

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **07-138166**

(43)Date of publication of application : **30.05.1995**

(51)Int.Cl.

A61K 31/725
A61K 31/715
A61K 35/80

(21)Application number : **06-111946**

(71)Applicant : **YAKULT HONSHA CO LTD**

(22)Date of filing : **28.04.1994**

(72)Inventor : **KIMURA TOSHIKO
SHIBATA HIDEYUKI
NAGAOKA MASATO
HASHIMOTO HIDESUKE
SAWADA HARUJI
YOKOKURA TERUO**

(30)Priority

Priority number : **05258883** Priority date : **24.09.1993** Priority country : **JP**

(54) ANTI-TUMOR AGENT AND ANCHORING INHIBITOR AGAINST HELICOBACTER PYROLII

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a new medicine which is effective for curing and preventing ulcers on gastric mucosa and for inhibiting Helicobacter pyrolii from anchoring to gastric mucosa.

CONSTITUTION: An antiulcerative and a Helicobacter pyrolii anchoring inhibitor which contains, as an active ingredient, fucoidin, a polysaccharide containing the extracts from red or brown algae.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] **20.06.2000**

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-138166

(43)公開日 平成7年(1995)5月30日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 61 K 31/725		9454-4C		
31/715	ACL	9454-4C		
35/80	Z	8217-4C		

審査請求 未請求 請求項の数8 FD (全5頁)

(21)出願番号	特願平6-111946
(22)出願日	平成6年(1994)4月28日
(31)優先権主張番号	特願平5-258883
(32)優先日	平5(1993)9月24日
(33)優先権主張国	日本 (JP)

(71)出願人	000006884 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号
(72)発明者	木村 逸子 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ クルト本社内
(72)発明者	柴田 英之 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ クルト本社内
(72)発明者	長岡 正人 東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ クルト本社内
(74)代理人	弁理士 板井 一穂

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗潰瘍剤およびヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤

(57)【要約】

【目的】 胃粘膜における潰瘍の治癒および予防、および胃粘膜に対するヘリコバクター・ピロリの定着を阻害するのに有効で、安全性にも優れている新規薬剤を提供する。

【構成】 紅藻類や褐藻類の抽出物中に含まれている多糖類・フコイダンを有効成分とする抗潰瘍剤およびヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤。

【特許請求の範囲】

- 【請求項1】 フコイダンを有効成分とする抗潰瘍剤。
- 【請求項2】 フコイダンを含有する紅藻類抽出物または褐藻類抽出物を有効成分とする抗潰瘍剤。
- 【請求項3】 フコイダンを含有するモズク抽出物を有効成分とする抗潰瘍剤。
- 【請求項4】 フコイダンが減成処理を施されたものである請求項1, 2または3に記載の抗潰瘍剤。
- 【請求項5】 フコイダンを有効成分とするヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤。
- 【請求項6】 フコイダンを含有する紅藻類抽出物または褐藻類抽出物を有効成分とするヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤。
- 【請求項7】 フコイダンを含有するモズク抽出物を有効成分とするヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤。
- 【請求項8】 フコイダンが減成処理を施されたものである請求項5, 6または7に記載のヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、胃粘膜における潰瘍、腫瘍等の発生予防および治療に有効な薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、胃粘膜に発生した潰瘍の治療のための抗潰瘍剤として胃酸分泌抑制を目的としたH₂-ブロッカーやプロトンポンプ阻害剤が用いられている。しかしながら、胃潰瘍はこれらの薬剤の投与を中止すると再発することが多く、その原因の一つとして、ある種の細菌の関与が近年指摘されている。

【0003】胃粘膜における潰瘍の発生に関与することが確認された細菌は、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) であって、本菌が胃粘膜に定着すると菌体から生産されるアンモニアによって胃炎が惹起され、ひいては胃潰瘍や胃癌に移行するものと考えられている (*Infectious Agents and Disease*, 1993, p. 294■309)。

【0004】この細菌は胃内では胃粘膜下に定着するので、抗生素質等の薬剤投与による排除がきわめて困難である。数種の抗生素質やプロトンポンプ阻害剤の併用による治療が試みられているが、この治療法は多量の抗生素質の長期投与を必要とするため、抗生素質耐性菌の出現に伴う種々の障害を招くおそれがある。

【0005】ヘリコバクター・ピロリは、胃粘膜上のコレステロール、糖脂質、硫酸化糖脂質、ラミニン、フコシル化糖鎖、シアル酸等を認識して胃粘膜に接着することが報告されている。そこで、これら特定の物質を認識しつつヘリコバクター・ピロリが胃粘膜へ接着する過程を何らかの物質によって妨害することにより該菌による胃粘膜の炎症発生を予防することも考えられている。へ

リコバクター・ピロリの接着を阻害する物質としてすでに報告されているものは、シアル酸を介して生じる接着を阻害するフェツィン、および、フコシル化糖鎖を介して生じる接着を阻害する分泌型 IgA であるが、これらは、量的供給等に問題があつて、ヘリコバクター・ピロリの接着阻害剤として実用化されるには至っていない。

【0006】一方、本発明者らは、ある種のビフィドバクテリウム菌や乳酸菌の菌体およびそれから抽出された多糖類が胃潰瘍の予防だけでなく治癒促進にも有効であり、抗潰瘍剤として使用可能などを先に見いだした（特開平4-5236号公報参照）。また、ある種の海藻由來のラムノース多糖・ラムナンやラムノースオリゴ糖にも同様の効果を見いだした（特願平5-61447号）。しかしながら、上記多糖類が示す抗潰瘍作用の機構はまだ解明されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記多糖類以外の多糖類についても確認された抗潰瘍作用に基づき、潰瘍の治癒および予防に有効な新規抗潰瘍剤を提供することを目的とする。本発明の他の目的は、ヘリコバクター・ピロリが胃粘膜に定着するのを阻害する作用を有する薬剤を提供し、該細菌が関与して発症する胃炎、胃潰瘍、胃癌等の予防と治療を可能にすることにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明が提供することに成功した新規抗潰瘍剤およびヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤（以下、これらの両方を含む意味で本発明薬剤という）は、いずれもフコイダン、すなわち主としてフコースからなる多糖類を有効成分とするものである。

【0009】フコイダンは試薬もしくは精製品が市販されており、本発明薬剤の製造原料としてはこの市販品を用いるのが最も簡単である。しかしながら、フコイダンはこれを豊富に含有する紅藻類または褐藻類から熱水または希薄酸水溶液により容易に抽出することができ、本発明薬剤にはこれら海藻の抽出物もしくは精製物を使用することもできる。紅藻類や褐藻類から抽出されたフコイダンは、通常、10万前後の分子量を有し、約50～60%またはそれ以上がフコースからなり、若干のウロニン酸を含む。構成糖の一部は硫酸エステル化されている。

【0010】フコイダンを豊富に含有し、本発明薬剤の原料として有利な海藻の例としては、紅藻類ではモズク (*Phaeophyceae Chordariales nemacystus*) が挙げられ、褐藻類ではウミウチワ、ワカメ、ヒバマタ、ヒマンスリア (*Himanthulia*)、ビフカリア (*Bifurcaria*)、フカス・ベシクロサス (*Fucus vesiculosus*) 等を挙げることができる。

【0011】フコイダンを含有する藻類からフコイダンを抽出する方法の代表的なものは次のとおりである。

熱水抽出法

藻体をその湿重量の約3倍量の水に懸濁させ、約10分～1時間、100℃に加熱する。次いで遠心分離して沈殿物を除き、上清に塩化カルシウムまたは酢酸バリウムを加えて沈殿するアルギン酸を除く。さらに透析を行って低分子量物質を除いたのち、凍結乾燥すると、フコイダンが得られる。

【0012】酸抽出法

藻体をその湿重量の約3倍量の酢酸水溶液または希塩酸(pH 2.0)に懸濁させ、室温ないし100℃で抽出を行う。次いで遠心分離して沈殿物を除き、上清をカ性ソーダ溶液で中和し、塩化カルシウム溶液を加えて沈殿するアルギン酸を除く。さらに限外ろ過および透析を行なって低分子量物質を除いたのち、凍結乾燥すると、フコイダンが得られる。

【0013】フコイダン含有率を高めるための抽出物精製手段としては、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー等がある。フコイダンは、海藻から抽出された高分子量のものをたとえば過ヨウ素酸処理による減成(degradation)を行うスミス分解反応(参考文献:生化学実験講座・第4巻「糖質の化学」下巻、東京化学同人発行;後記製造実施例3参照)等により平均分子量約1万程度まで低分子化させてから本発明薬剤に用いてよい。低分子化により有効性が低下することはなく、一方、溶液粘度が低下して取り扱いが容易になる利点がある。

【0014】フコイダンは、前記ビフィドバクテリウム菌や海藻から分離された多糖類に勝るとも劣らない抗潰瘍作用を示す。本発明による抗潰瘍剤およびヘリコバクター・ピロリの定着阻害剤は、経口的に投与される。消化管に入ったフコイダンは患部に到達することにより潰瘍治癒作用を行うものと思われる。フコイダンは、ヘリコバクター・ピロリの胃粘膜への接着を阻害することによっても、胃潰瘍や胃癌に進行する胃粘膜の炎症を予防することが確認された(後記試験例4参照)。

【0015】本発明薬剤は食用藻類由来の多糖類・フコイダンからなるものであるから、安全性が高く、したがって、剤形や投与量は任意に選定することができる。しかしながら、一般的には、本発明薬剤を薬学的に許容できる液状または固体状の担体と配合し、かつ必要に応じて溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等に製剤して使用するのが適当である。

【0016】本発明薬剤の成人1日当たりの好適投与量は、約1mg/kg～500mg/kg、好ましくは5mg/kg～50mg/kgである。本発明薬剤は、そのまま経口投与するほか、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

【0017】

【実施例】

製造実施例1

モズクの藻体を蒸留水で洗浄したのち、藻体1g(湿重)当たり3mlの水を加えて100℃に1時間加熱し、热水可溶成分を抽出する。得られた抽出液をナイロンクロスで濾過後、濾液を9000rpmで60分間遠心分離し、上清を分画分子量3万の限外濾過膜を用いて濃縮する。次いで濃縮液に、濃度が30～50%になるようにエタノールを加え、遠心分離して不溶物を除去する。

【0018】上記方法により得られた上清を、蒸留水にて透析後、凍結乾燥して、フコイダン(純度90%以上)を得た。収率0.5重量%(湿藻体重量基準)。得られたフコイダンは、ガスクロマトグラフィーにより成分分析を行なったところ、フコースを主成分とし、若干のウロニン酸を含有していた。また、セファクリルS-200によるゲル濾過を行なった結果、分子量は約10万と推定された。¹³C-NMRによる測定結果は、この多糖類が6-デオキシ糖の重合体を主成分とすること、および、若干のウロニン酸を含むことを示した。

【0019】製造実施例2

モズクからフコイダンを抽出する処理を0.01N塩酸により100℃で30分間行なったほかは製造実施例1と同様にして、フコイダンを得た(湿藻体重量基準収率1.5重量%)。このフコイダンは、純度90%以上、フコース含有量3377nmol/mg、硫酸基含有量1442nmol/mgであった。

【0020】製造実施例3

製造実施例1で得られたフコイダン7gを0.2Mの過ヨウ素酸溶液(10mM酢酸緩衝液溶液、pH 5.0)500mlに溶解し、遮光下に3日間静置して反応させた。その後、エチレングリコール1mlを加えて過剰の過ヨウ素酸を分解し、反応液にホウ酸緩衝液を加えてpHを8.0に調整したのち水素化ホウ素ナトリウム4gを加えて還元した。反応終了後、酢酸を加えて中和し、限外ろ過により濃縮と脱塩を行なった。次いで塩酸を加えてpHを2.0にして脱アセタール化処理を行い、反応液を分画分子量1000の透析膜で透析し、内液を凍結乾燥することにより、低分子化フコイダン(平均分子量約1万、収量3.44g)を得た。

【0021】試験例1

製造実施例1で得られたフコイダンについて、抗潰瘍作用を酢酸誘発潰瘍を用いて試験した。酢酸誘発潰瘍は、8週令のSDラット(体重250～300g)をネンブタール麻酔下に開腹し、胃を取り出して胃体部粘膜下組織に20%酢酸を0.03ml注入することにより発生させた。上記手術の後、2日目から7日目までの間、経口的に上記フコイダンを投与し、8日に胃を摘出して潰瘍形成部の面積(長径×短径)を測定し、これを潰瘍指数として次式により治癒率を算出した。なお、試験期間中、餌および水は自由摂取させた。

【0022】

$$\text{治癒率} (\%) = (1 - \text{薬物投与群の潰瘍指数} / \text{対照群の潰瘍指数}) \times 100$$

試験結果（各群10匹のラットについての値の平均値）

* 【0023】

を表1に示す（表中、潰瘍指数として表示した数値は平均値と標準偏差である）。

【表1】

*

投与量 (mg/ラット)	潰瘍指数	治癒率 (%)
0 (対照群)	11.0 ± 3.2	—
1.5 × 8	8.7 ± 3.4	21.1
3.0 × 8	5.6 ± 2.9 *	49.1
6.0 × 8	5.9 ± 1.6 *	45.9

* 危険率5%以下で有意差あり

※ 同様の試験を行なった。その結果を表2に示す。

【0024】試験例2

【0025】

製造実施例2で得られたフコイダンについて、試験例1 ※ 【表2】

投与量 (mg/ラット)	潰瘍指数	治癒率 (%)
0 (対照群)	12.8 ± 3.9	—
1.5 × 8	7.6 ± 3.6 *	40.4
3.0 × 8	9.2 ± 5.3	28.4
6.0 × 8	8.7 ± 4.0 *	32.0

* 危険率5%以下で有意差あり

★結果を表3に示す。

【0026】試験例3

【0027】

フコイダン（シグマ社製市販品；Fucus vesiculosus 由 20 【表3】

来）について、試験例1と同様の試験を行なった。その★

投与量 (mg/ラット)	潰瘍指数	治癒率 (%)
0 (対照群)	11.7 ± 3.1	—
1.5 × 8	8.7 ± 1.9 *	26.1
3.0 × 8	7.3 ± 3.7 *	38.4
6.0 × 8	6.3 ± 2.2 *	46.4

* 危険率5%以下で有意差あり

【0028】試験例4

マイクロプレート上にヘリコバクター・ピロリを固相化し、その上に、ヘリコバクター・ピロリの定着因子と考えられているフコース糖鎖を結合してビオチンで標識したBSA（牛血清アルブミン）を加えると、ヘリコバクター・ピロリと接着する。その接着量は、発色反応により求めることができる。上記接着現象がフコイダンを添加したときどの程度阻害されるかを指標にして、製造実施例2で得られたフコイダンおよび製造実施例3で得られた低分子化フコイダンについてヘリコバクター・ピロリの定着阻害活性を測定した。具体的測定方法は次のとおりである。

【0029】ヘリコバクター・ピロリを固相化したプレート（バイオメリカ社製のピリカプレート）の各ウェルに、標識されたフコース糖鎖結合BSA（0～0.04 μg/ml）を加え、37℃で1時間反応させる。その後、緩衝液で洗って未結合の糖鎖結合BSAを除き、次いで各ウェルにストレプトアビシン溶液（濃度0.05 mg/ml）を100 μl加え、室温下で30分間反応させる。これにより、ウェル中に残っていた糖鎖結合BSAのビオチンにストレプトアビシンが選択的に結合する。洗浄して過剰のストレプトアビシンを除去し、次いでペーオキシダーゼ標識したビオチン溶液（2.5 μg/ml）を100 μl ☆50

☆加える。室温下に30分間反応させたのち、過剰の酵素標識ビオチンを洗浄除去する。本操作により糖鎖結合BSAとストレプトアビシンの複合体に選択的に酵素標識ビオチンが結合する。この酵素活性（ペーオキシダーゼ活性）を、基質溶液（KPL社製ABTSペーオキシダーゼ基質システム）100 μlを加え室温で10分間反応させたのち波長405 nmの吸光度を測定する。測定される吸光度は添加されたフコース結合BSAの量に依存して増加する。

【0030】上記試験におけるフコース結合BSAとヘリコバクター・ピロリの反応系に5～150 μg/mlの範囲でフコイダンを共存させ、同様にして吸光度を測定した。その結果を表4および表5に示す。測定される吸光度がフコイダンの添加量増加にともない減少することから、ヘリコバクター・ピロリと糖鎖結合BSAの接着がフコイダンによって阻害されたことがわかる。

【0031】

【表4】 製造実施例2によるフコイダンのH・ピロリ定着阻害活性

7

<u>フコイダン濃度(μg/ml)</u>	<u>吸光度(405nm)</u>
0	1.219
1	0.901
2.5	0.430
5	0.297
7.5	0.132
10	0.092
100	0.000

8

* 促進作用とヘリコバクター・ピロリの定着阻害作用とを有し、潰瘍や癌に移行する胃粘膜の炎症の予防と治療に有効な薬剤が提供される。本発明の薬剤はモズク等、食用海藻類を原料にして安価に大量に供給可能であり、且つ安全性が高い点でも優れている。

【0032】

【表5】 製造実施例3による低分子化フコイダンのH 10
・ピロリ定着阻害活性

<u>フコイダン濃度(μg/ml)</u>	<u>吸光度(405nm)</u>
0	1.284
10	1.254
15	0.895
20	0.725
25	0.501
50	0.209
100	0.098
150	0.092

【0033】

【発明の効果】 上述のように、本発明によれば潰瘍治癒 *

フロントページの続き

(72) 発明者 橋本 秀介

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ
クルト本社内

※ (72) 発明者 澤田 治司

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ
クルト本社内

30 (72) 発明者 横倉 輝男

東京都港区東新橋1-1-19 株式会社ヤ
クルト本社内